

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Propagación in vitro de *Ismene amancaes* (R.&P.)

Herbert "Amancay" (*Amaryllidaceae*)

TESIS

para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular y
Genética

AUTOR

Edisson Pedro Pascual Mendoza

Lima-Perú

2007

**A mis padres Pedro Pascual y Rosa Mendoza
por el apoyo brindado en todo momento.**

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Blga. M. Sc. Mery Suni Ninataype, responsable del Laboratorio de Fisiología Vegetal, por su apoyo incondicional y consejos para la realización del presente trabajo.

A mis colegas y amigos del Laboratorio de Fisiología Vegetal, Gabriel, Giovana, Enoc, Noema, Boris; personas que de una u otra manera me apoyaron en la realización de la tesis y también por sus consejos.

Al profesor Biólogo Rolando Estrada Jiménez, responsable del Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología, por su amistad y apoyo incondicional para la realización de la tesis. Asimismo al profesor Biólogo Héctor Sánchez Sotomayor, por su amistad, apoyo y consejos brindados.

A mis amigos del Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología, Mariela, Ibeth, Jessica, Arturo, Alex, Edwin, Marielena, Alejandro, Dino, Isaac, Gianina, Jhoel que en paz descanse y muchos más con quienes compartí buenos momentos en el laboratorio, tanto antes como después de la realización de la tesis.

A todas las personas de la ONG PRODENA-Arequipa por su apoyo y financiamiento de la Tesis.

Por último agradecer al personal de la Facultad, estamos hablando del señor Luis Ulloa, Armando, Cora y demás por sus apoyos en algunas etapas del proceso de la tesis, además de brindarme su amistad.

ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftaleno acético
BAP	Bencil amino purina
CA	Carbón activado
Medio MS	Medio básico de cultivo Murashigue y Skoog
Mg/L	Miligramos por litro
NaOCl	Hipoclorito de sodio
KOH	Hidróxido de potasio

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Reseña histórica.....	3
2.2. Ubicación taxonómica.....	4
2.3. Distribución y situación actual.....	5
2.4. Características morfológicas y fenológicas.....	6
2.5. Estudios recientes.....	8
2.6. Propagación natural.....	8
2.7. Micropropagación.....	9
2.7.1. Organogénesis directa.....	11
2.7.2. Micropropagación de Monocotiledóneas.....	11
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1. Lugar de Ejecución.....	13
3.2. Material Biológico.....	13
3.3. Métodos.....	13
3.3.1. Desinfección y características del material biológico.....	14
3.3.2. Obtención del explante.....	14
3.3.3. Efecto de la luz y de los tratamientos hormonales sobre la regeneración de bulbillos.....	15
3.3.4. Diseño experimental.....	16
IV. RESULTADOS	17
4.1. Características y desinfección del material biológico.....	17
4.2. Características de la formación de bulbillos sobre los explantes.....	18

4.3.	Efecto de la luz y de los tratamientos hormonales sobre la regeneración de bulbillos (formación de bulbillos sobre los explantes).....	19
4.3.1.	Primer Experimento.....	19
4.3.2.	Segundo Experimento.....	19
4.3.3.	Tercer Experimento.....	21
V.	DISCUSIÓN.....	22
5.1.	Desinfección.....	22
5.2.	Formación de bulbillos sobre los explantes.....	23
5.3.	Efecto de la luz y de los tratamientos hormonales sobre la regeneración de bulbillos.....	24
	-Factor luz.....	24
	-Tratamientos hormonales.....	25
VI.	CONCLUSIONES.....	27
VII.	RECOMENDACIONES.....	28
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
IX.	ANEXOS.....	36

RESUMEN

Ismene amancaes (Amaryllidaceae) es una planta endémica de las Lomas de Lima con alto potencial ornamental e importancia histórica y botánica, que se encuentra amenazada por la destrucción de su hábitat natural; lo cual hace urgente tomar medidas para su conservación. Se ha evaluado métodos para su propagación natural los cuales proveen una baja tasa de multiplicación. Por ello el objetivo de esta investigación fue desarrollar un método que permita la micropropagación de *I. amancaes* como una alternativa para su conservación. Se colectaron bulbos de las Lomas del Santuario de Amancaes (Pachacamac). Se obtuvieron explantes (doble escamado) que fueron mantenidos en tubos con medio básico de cultivo Murashigue & Skoog, suplementado con azúcar al 3%, 0.5% de carbón activado y 4 niveles de ácido naftaleno acético (0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L) con 4 niveles de bencil amino purina (0; 5; 10 Y 15 mg/L), se ajustó el pH a 5,7 incubándose en dos ambientes: oscuridad total y luz (fotoperiodo de 16 horas diarias) con 25° C de temperatura. Se obtuvo exitosamente plántulas in vitro (bulbillos) de *I. amancaes*, observándose de uno a tres bulbillos por explante. El rango óptimo de ANA para la micropropagación del amancay fue 0,0 a 0,5 mg/L combinados con BAP de 0,0 a 5,0 mg/L. La luz no incrementó la inducción de bulbillos. No fue necesaria la inducción de raíces para el establecimiento de bulbillos en invernadero.

Palabras clave: *Ismene amancaes*, propagación in vitro, organogénesis, Lomas, doble escamado.

ABSTRACT

Ismene amancaes (Amaryllidaceae) is an endemic plant of Lomas in Lima. Very little is known about the natural propagation. It provides a slow rate of multiplication. The objective of this research was to develop one methodology that permits to multiply *I. amancaes* as an alternative for conservation. Bulbs were collected in "Santuario de Amancaes" lomas (Pachacamac). Explants (twin scales) were cultured on tubes with culture medium supplemented with 3% sucrose, 0,5% activated charcoal and 4 levels of ANA (0; 0,5; 1,0 and 1,5 mg/L) with 4 levels of BAP (0; 5; 10 and 15 mg/L), pH 5,7. It was incubated in two environments: dark and light (16 hour light/8 hour dark photoperiod). *I. amancaes* in vitro plantlets (bulblets) were obtained successfully, showing 1 – 3 bulblets by explants. Optimal status from ANA for micropropagation was 0,0 to 0,5 mg/L combined with BAP 0,0 to 5,0 mg/L. Bulblet induction was not increased by light. Root induction was not necessary for glasshouse establishment.

Key words: *Ismene amancaes*, in vitro propagation, organogenesis, Lomas, twin scale.

I.-INTRODUCCIÓN

Ismene amancaes (R.&P.) Herbert “amancay” planta característica de las lomas costaneras ha sido muy apreciado desde el pasado debido a la belleza de su flor, su color, tamaño grande, forma y fragancia. Durante la fiesta de San Juan en el mes de Junio, la aristocracia limeña y el pueblo visitaban las Pampas de Amancaes, ubicada al pie de las Lomas de Amancaes, en el distrito del Rímac (Herrera, 1940) y se engalanaban adornándose con las bellas flores de amancaes. A la fecha no se tiene registro de dichas Pampas, inclusive la parte correspondiente al hábitat del amancay en las Lomas ha desaparecido por la expansión urbana (Cuya & Sánchez, 1991; Cano et al., 2002). De modo que en la actualidad esta especie se encuentra principalmente desarrollándose de manera natural en las lomas del sur de Lima.

Se estima que la planta florece entre los 5 a 7 años. Su único medio de propagación natural es por semilla produciendo hasta 13 semillas por flor. Asimismo produce 7 (Suni et al., 2001; Agüero & Suni, 1999) y en algunos casos 13 (observación personal) flores por planta, dependiendo del tamaño del bulbo. Además no todas las semillas culminan con el desarrollo de bulbillos ya que sufren el ataque de roedores e insectos quienes se alimentan de las semillas y de los bulbos. Inclusive cambios climáticos como los ocasionados por el Evento del Niño afectan negativamente el proceso de la floración y fructificación, bajando la tasa de propagación. Se estima que sólo el 30% de las plantas florecen bajo estas condiciones (Agüero & Suni, 1999). También la actividad extractiva del poblador de las zonas aledañas a las Lomas o los

visitantes quienes la recolectan por la belleza de su flor, así mismo el pastoreo, la expansión de las zonas urbanas y extensión de la agricultura, han ocasionado en los últimos años una disminución de su área de distribución y número de individuos en su medio ambiente natural lo cual ha llevado a considerarla como una especie vulnerable por el INRENA mediante Decreto Supremo N° 043-2006-AG.

Esta situación de amenaza y riesgo para esta importante especie hace necesario y urgente desarrollar técnicas que permitan la propagación rápida para su protección adecuada. Es por ello que en el presente trabajo se propone realizar estudios de multiplicación rápida mediante técnicas de cultivo in vitro (micropropagación o propagación in vitro) de la especie lo cual ha de permitir en primer lugar contar con bulbillos que sirvan para el repoblamiento de las lomas donde se ha depredado y reducido su población. Asimismo permitirá contar con material para otros estudios de investigación posteriores, por ejemplo de mejoramiento genético de la especie.

Objetivo general:

- Propagación in vitro de la especie *Ismene amancaes* (R.&P.) Herbert mediante el sistema de organogénesis directa.

Objetivos específicos:

- Introducción de la especie *Ismene amancaes* a sistemas de cultivo in vitro.
- Determinar las condiciones óptimas para la regeneración de *Ismene amancaes*: necesidad del factor luz, niveles de ácido naftaleno acético y de bencil amino purina.

II. ANTECEDENTES

2.1. Reseña histórica

Ismene amancaes (R.&P.) Herbert es una planta herbácea, con bulbo perenne el cual era muy apreciado desde tiempos prehispánicos. Herrera (1940), menciona que así como la cantuta (*Cantua buxifolia* Juss), fue considerada flor ornamental por excelencia en la época del imperio incaico y hoy es reconocida oficialmente como flor nacional peruana; asimismo en los dominios del señorío de Cusimancu, que se asentaba en el fértil valle del Rímac, tuvo igual importancia el Amancay que adornaba con sus flores amarillas y fragantes las colinas próximas a la ciudad de Lima. Su aparición ocurría en medio de un paisaje desolado y semidesértico, con las primeras garúas que se presentaban en la estación de invierno.

La gran estimación que tenía la población de Lima a esta flor se ve manifestada durante la fiesta de amancaes que se realizaba cada 24 de Junio en la zona de las Pampas de Amancaes y donde se hacía encuentros de grupos artísticos, grandes meriendas, bailes al aire libre y donde la gente de todas las clases sociales se engalanaba y retornaba casi cubierto de las flores de amancaes (Reyes, 2000).

A partir de la década de los sesenta del siglo XX, la migración poblacional ha originado un crecimiento exponencial de la población limeña y la aparición de asentamientos humanos, razón por lo que se ha deteriorado las pampas,

cerros y quebradas de lo que conformaba en su conjunto las Lomas de Amancaes (Agüero, 2002).

Hoy en día la tradicional fiesta de amancaes queda sólo en el recuerdo de los antiguos limeños y lo que era la pampa de amancaes no existe, borrando de esta manera la existencia del amancay en este lugar.

2.2. Ubicación taxonómica

Ismene amancaes (R.&P.) Herbert fue colectada por primera vez con fines científicos por los botánicos españoles Hipólito Ruiz y José Pavón, miembros de la expedición botánica enviada al Perú por el gobierno de Carlos III de España a finales del siglo XVIII.

Esta especie se ha registrado bajo nombre genéricos distintos: primero *Pancratium amancaes*, posteriormente *Ismene amancaes* y finalmente *Hymenocallis amancaes* (R. & P.) Nichols. En la actualidad esta especie se encuentra reportado como *Ismene amancaes* (R. & P.) en “Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Perú” (1993) de Brako & Zarucchi.

De acuerdo al Sistema de Engler y Prantl, modificado por Wederman (1964) se le ubica como sigue:

División : Angiospermae
Clase : Monocotyledoneae
Orden : Liliales
Familia : Amaryllidaceae
Género : *Ismene*
Especie : *Ismene amancaes* (R. & P.) Herbert

A *Ismene amancaes* se le conoce con los siguientes nombres vulgares: amanca, amancaes, amancay, flor de amancaes, amancaes, janancai(y), jamanackai y lirio de amancaes (Soukup, 1993).

2.3. Distribución y situación actual

El amancay es un componente característico del ecosistema denominado Lomas que corresponde a la Ecorregión del Desierto del Pacífico (Brack, 2000). Esta especie es endémica de la costa central de Perú y su presencia es dependiente de la alta humedad ambiental que se presenta en los meses de invierno en la costa Peruana, desde Cerro Campana, en Trujillo hasta Tacna (Agüero, 2002).

Agüero (2002) hace una aproximación de la actual distribución del amancay el cual comprende las lomas de los departamentos de La Libertad, Ancash y Lima, siendo este último departamento donde se le ha reportado en varias Lomas (Lachay, Carabayllo, Amancaes, Manzano, Lurín, Pachacamac y Asia).

Así mismo Agüero (2002) menciona que las lomas de la Reserva Nacional de Lachay (ubicada dentro de la provincia de Huaura) es la única área natural protegida para la especie, mientras que las otras lomas, donde se encuentra todavía el amancay se encuentran deterioradas y corren el peligro de desaparecer debido a la reducción de sus áreas naturales por actividades antropogénicas como son la explotación del subsuelo (cementeras), sobrepastoreo del ganado de las comunidades, la expansión urbana y el uso de estos suelos para la agricultura; por lo que si las autoridades competentes

no hacen ninguna gestión para el estudio técnico y protección de las lomas, el amancay y la vegetación asociada a su hábitat corren el riesgo de desaparecer.

Las asociaciones civiles, ONGs ambientalistas y la empresa privada pueden apoyar para impedir que desaparezcan estas áreas naturales. Un buen ejemplo es el “Santuario de Amancay” el cual es un área protegida de carácter privado que se creó con el fin de recuperar el amancay y la vegetación de lomas. Este santuario ubicado al Noreste de Pachacamac no sólo realiza estudios ecológicos y científicos, sino que busca inculcar en la gente la pasión por las plantas, el culto al campo y a la vida.

Lamentablemente el amancay ha desaparecido en las Lomas de Amancaes (ubicada en el distrito del Rímac) debido a la expansión humana, la cual ha ocupado el hábitat donde se desarrollaba. Sin embargo queda parte de estas Lomas por lo que la Municipalidad del Rímac debería gestionar un estudio técnico, declarar área protegida y repoblar el amancay en las Lomas que llevan su nombre.

2.4. Características morfológicas y fenológicas

El amancay como toda especie bulbosa tunicada presenta una estructura compacta subterránea, denominada bulbo, el cual consiste en una o más yemas rodeadas de hojas gruesas y carnosas a modo de escamas, los cuales nacen de un tallo muy corto en forma de un disco, denominado disco basal. Así mismo de la parte inferior de este disco basal nacen las raíces que son

cilíndricas, de color blanquecino, con pliegues transversales pocos perceptibles (observación personal, 2004)

La flor, según Velarde (1947), presenta una paracorola estaminal vistosa de tamaño variable de donde nacen los filamentos doblados en posición introrsa. El fruto es una cápsula trilocular con semillas esféricas más o menos grandes, jugosas y de color verde por la presencia de una capa de células clorofilianas, asimiladoras. Sus óvulos (generalmente menos de 10 en cada lóculo) son ascendentes, de color blanquecino y ubicado casi siempre en la parte inferior de la intersección de los tres tabiques.

Según Hartmann & Kester (1995) el crecimiento de un bulbo presenta dos fases: una fase vegetativa, en la cual el bulbillo crece hasta llegar al tamaño adulto donde comienza a florecer y otra fase reproductiva, donde se induce a su primera floración con el desarrollo de un tallo floral (escapo) que sale del centro del bulbo y sosteniendo las flores a varios centímetros sobre el nivel del suelo.

Específicamente el amancay inicia rápidamente su desarrollo con el inicio del periodo de vegetación de Lomas y completa su ciclo, es decir su desarrollo vegetativo y reproductivo (floración, fructificación, producción de semillas, germinación hasta el desarrollo del bulbillo) durante dicho periodo de humedad, mostrando una alta especialización a las condiciones medio ambientales (observación personal, 2004).

Según Traub (1963), esta especie presenta un número cromosómico de 46 (2n) sonriendo los cromosomas de tamaño grande. Así mismo Guevara et al. (2003) menciona que muestras de esta especie colectadas en periodo de Lomas presenta numerosos nucleolos asociado a la alta actividad de transcripción.

2.5. Estudios recientes

A pesar de la importancia de esta especie son escasos los estudios realizados. Agüero (2002) estudió el efecto de la humedad edáfica y propagación de esta especie bajo condiciones naturales (Lomas de Lachay) y en invernadero. Suni et al., (2001) evaluó la respuesta de la especie bajo condiciones de cultivo, obteniéndose resultados similares o mejores a los obtenidos bajo condiciones naturales.

Sin embargo, falta mucho por conocer en esta especie. En primer lugar se debería obtener métodos de propagación efectiva a fin de asegurar la conservación de la especie, repoblando en los ambientes donde su población es escasa o ausente y poder contar con material para realizar más investigaciones. Así también se debería determinar los factores externos que regulan la floración, el desarrollo del bulbo, inclusive los factores genéticos implicados en estos procesos. Esto permitirá explotar su potencialidad económica como planta ornamental (Le Nard & De Hertogh, 2002).

2.6. Propagación natural

El amancay presenta como único medio de propagación natural sus semillas, las cuales son producidas anualmente en la época de lomas. Las semillas maduras producidas caen al suelo pero no todas germinan. No se ha podido

observar el desarrollo de hijuelos en la base del bulbo madre para esta especie, mientras que para otras bulbosas ornamentales esto se desarrolla de manera natural, ejemplo de esto son los narcisos, los amarillos. Así mismo, el manejo de su propagación vegetativa por división del bulbo (estaca de bulbo) permite la obtención de un número relativamente bajo de bulbillos es decir de 4 a 16 bulbillos por bulbo (Agüero, 2002). Esta baja tasa de propagación podría mejorarse enormemente mediante las técnicas de cultivo de tejidos que presentan asimismo múltiples ventajas. Así, la micropropagación ha resultado una excelente alternativa a la propagación convencional. De esta manera se ha obtenido buenos resultados para muchas especies de bulbo, comerciales y algunas especies amenazadas como *Narcissus*, *Lilium*, *Crinum*, *Hyacinthus* y *Amayllis* (Steinitz & Yahel, 1982; Chang et al., 2000; Ulrich et al., 1999; Kim et al., 1981; De Bruyn et al., 1992).

2.7. Micropropagación

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas (explantes), de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones nutricionales y ambientales (Hartmann & Kester, 1995).

El término micropropagación fue usado por primera vez en 1968 por Hartmann & Kester en su conocido libro, *Propagación de Plantas*, para designar “cualquier” proceso aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que

permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente.

Actualmente la micropropagación es considerado como término general para designar varias de las técnicas utilizada en la multiplicación in vitro, entre ellas tenemos el cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares; la organogénesis directa, la organogénesis indirecta, la embriogénesis somática, el microinjerto, el cultivo de embriones y esporas, etc. (Roca, 1991).

La micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, 1978), ornamentales (Hugues, 1981) y más recientemente en especies leñosas (Thorpe, 1983). En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, siendo las más importantes:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipos.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en corto tiempo.
- Mayor control de la calidad sanitaria del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material in vitro de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existan pocos individuos.

2.7.1. Organogénesis directa

La organogénesis directa comprende la formación de brotes adventicios o de raíz a partir de los explantes, sin la formación de callo. Los órganos o partes de planta que contienen rudimentos de yemas o que tiene un potencial para la producción de meristemas adventicios son usados para organogénesis directa.

Después de las primeras observaciones sobre la formación de raíces adventicias (White, 1939) y de raíces principales (Nobecourt, 1939) en cultivos de tejidos, Skoog (1944) demostró el efecto estimulante de la auxinas en la formación de raíces y su efecto inhibitor en la formación de yemas.

Posteriormente el hallazgo del factor que promovía la división celular en preparaciones degradadas de ADN, identificado como cinetina (Miller et al., 1955), condujo al estudio realizado por Skoog & Miller (1957), en el que se demostró la importancia de las proporciones de auxina : citocinina en la determinación de la respuesta morfogénica in vitro. Una proporción alta de auxina comparada con la de citocinina favorecía la formación de raíces, mientras una proporción baja favorecía la formación de yemas. Esto sugirió que el balance de ciertos factores (reguladores de crecimiento) afectaría el proceso de diferenciación y resultó ser la base para el desarrollo de un medio definido de organogénesis in vitro.

2.7.2. Micropropagación de monocotiledóneas

Las monocotiledóneas fueron consideradas por mucho tiempo como material de difícil manejo in vitro, sin embargo dentro de las últimas décadas un

incremento en el número de las monocotiledóneas ha sido exitosamente cultivados (Zaidi et al., 2000). La mayoría de los bulbos y cormos pertenecientes a las liliáceas, iridáceas y amarilidáceas son consideradas como especies con lenta propagación natural. Estos bulbos y cormos son las mayores flores de cultivo en muchos países como Holanda, Reino Unido, Estados Unidos y Japón al igual que muchas especies endémicas que están en peligro de extinción por la sobreexplotación y la expansión de la población humana. Ante estos problemas, la tecnología de cultivo de tejido influyó grandemente la demanda de rápida multiplicación y la propagación clonal de monocotiledóneas de crecimiento lento y en peligro de extinción.

La utilización de porciones subterráneas de monocotiledóneas ornamentales fue introducida por Stone & Holling en 1970. Stone en 1973 introdujo la técnica de producción de estacas de bulbo. Los bulbos son parcialmente dividido en 8 a 16 piezas y enterrados dentro de bolsas de polietileno con suelo. Posteriormente el suelo fue remplazado por medio de cultivo para la propagación in vitro. La técnica más avanzada denominada doble escamado (twin scaling) fue desarrollado para la propagación de *Hippeastrum*, *Narcissus* y otras amarilidáceas. De un bulbo grande se obtuvo de 30 a 60 explantes doble escamado. Cada doble escamado consistió de dos piezas de escamas unidas por una pequeña pieza de la placa basal. Esta técnica ha sido útil para un amplio rango de amarilidáceas, iridáceas y liliáceas, debido a que no tienen problemas de propágulos anormales como si lo obtienen otras técnicas de propagación que pasan por un estadio previo de formación de callo (Hussey, 1982).

III.-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Ejecución

El presente estudio se llevó a cabo en los ambientes del Laboratorio de Fisiología Vegetal y del Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la micropropagación.

3.2. Material Biológico

Los bulbos de amancay fueron colectados del Santuario de Amancay, área protegida de carácter privado, ubicada a 6 Km al Noreste del pueblo de Pachacamac en la quebrada de Río Seco (figura 1 y 2).

Se realizaron tres experimentos los cuales fueron llevados a cabo en los meses de marzo, abril y setiembre: Los bulbos utilizados en cada experimento tenían características similares. La identificación de los bulbos (figura 3) fue realizada por especialistas del Santuario de Amancay y de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3. Métodos

Para la propagación in vitro del amancay se utilizó uno de los métodos más conocidos para especies bulbosas de la familia de las Amarilidáceas, denominada organogénesis somática directa o inducción directa de brotes adventicios. Los explantes utilizados en este método consistían en dos pequeñas porciones de catáfilos unidas por una pequeña porción de la placa basal denominado escamado doble (en inglés, twin scale).

3.3.1 Desinfección y características del material biológico

Los bulbos colectados fueron llevados al laboratorio donde se procedió a limpiarlos, pesarlos y medirlos antes de su desinfección.

Durante su desinfección se retiró las raíces y las escamas exteriores secas denominada en su conjunto “túnica”. Se enjuagó con abundante agua de caño y se les introdujo a la cámara de flujo laminar. Allí se descartó los dos tercios superiores de cada uno de los bulbos, utilizando sólo el tercio inferior de cada uno de los bulbos el cual contenía la placa basal (figura 4 y 5). Este tercio del bulbo se desinfectó de la siguiente manera: inmersión en alcohol al 70% por un minuto, inmersión en lejía comercial al 2,6 ó 4% por 15 ó 30 minutos según cada experimento. Posteriormente se enjuagó con agua destilada estéril tres veces.

3.3.2 Obtención del explante

Con la ayuda de una pinza y bisturí, el tercio inferior del bulbo fue dividido longitudinalmente en cuatro partes. De cada cuarta se obtuvo los explantes, los cuales consistieron en 2 escamas de un centímetro cuadrado aproximadamente cada una, unidas por un pequeño segmento de la placa basal (escamado doble), ver figura 6. Los explantes fueron colocados en tubos de ensayo con la porción de la placa basal introducida en el medio de cultivo (figura 7).

3.3.3 Evaluación del efecto de la luz y de los tratamientos hormonales sobre la regeneración de bulbillos

Con el fin de observar el efecto de las hormonas vegetales y de luz en los tres experimentos se utilizó un medio base de cultivo *in vitro*, constituido por sales minerales y vitaminas de Murashigue y Skoog (MS), azúcar 30g/L, agar 8g/L y carbón activado 5 g/L.

Este medio de cultivo se complementó con dos hormonas vegetales, una auxina (ácido naftaleno acético: ANA) en concentraciones de 0; 0,5; 1; y 1,5 mg/L; y una citocinina (6-Bencilamino purina: BAP) en concentraciones de 0; 5; 10 y 15 mg/L (Cuadro 1). Se ajustó el pH del medio de cultivo a 5,7 con KOH, se dispensaron 10 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo (25 x 150 mm) y autoclavó por 20 minutos. Posteriormente los medios de cultivo fueron llevados a un cuarto de crecimiento a 24 +/- 1 °C hasta su utilización.

El mismo procedimiento antes descrito fue seguido para observar el efecto de la luz (fotoperiodo 16 horas diarias y oscuridad continua) en la regeneración de bulbillos.

Todo el material del experimento fueron mantenidos en un cuarto de crecimiento con dos ambientes: una en oscuridad total y la otra iluminada, con un fotoperiodo de 16 horas diarias provisto por fluorescente luz día y a 3 Klux de luminosidad.

La evaluación se realizó semanalmente hasta la quinta semanas.

3.3.4 Diseño experimental

Los factores a evaluar fueron: tratamientos hormonales y luz.

Para evaluar el factor hormonal se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4 x 4 (cuatro dosis de ANA combinada con cuatro dosis de BAP) con 10 repeticiones, conformando 160 unidades experimentales (UE), cada uno, con un explante. Asimismo esta combinación hormonal (160 UE) se repitió para evaluar el factor luz (fotoperiodo 16 horas diarias y oscuridad continua); teniendo un total de 320 UE. Este diseño experimental se repitió en tres diferentes meses del año.

La variable respuesta evaluada fue la presencia o ausencia de bulbillos regenerados en cada explante. Los resultados fueron procesados por el programa estadístico R. Para todos los casos se realizó un análisis de varianza con la estructura que se presenta en el cuadro 2.

IV RESULTADOS

4.1. Características y desinfección del material biológico

Las características del material biológico utilizado en cada uno de los tres experimentos, su fecha de colecta (obtenido de estado silvestre) y de instalación son dadas en el cuadro 3.

Los bulbos presentaban una túnica membranosa de color pardo, la que extraída deja ver una escama carnosa externa de color blanco la cual envuelve a las otras que se encuentran en su interior. De estas escamas blanquecinas concéntricas se obtuvo los explantes, escamado doble (figura 6).

El proceso de desinfección, tanto el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio como la concentración, tuvo que ser ajustado para reducir el porcentaje de contaminación. En el primer experimento la contaminación fue muy alta (73.5%).

Por ello paralelo al segundo experimento se realizó un ensayo para optimizar la desinfección, ver cuadro 4. Se encontró que utilizando hipoclorito de sodio al 4% y en un tiempo de 30 minutos se reducía considerablemente el porcentaje de contaminación. Estos resultados fueron utilizados en el tercer experimento, ver cuadro 5.

4.2. Características de la formación de bulbillos sobre los explantes

Los explantes (escamado doble) obtenidos de las escamas de los bulbos de *I. amancaes* fueron de color blanquecino (sin clorofila). El color de los explantes se mantuvo en los medios cultivados en oscuridad total. Si por el contrario los explantes eran colocados bajo la luz se ponían de color verde en días posteriores. Asimismo se observó, que si los explantes no regeneraban se ponían de un color rojizo (proceso de oxidación) y posteriormente se degeneraban. Dicha oxidación se observó frecuentemente en todos los explantes colocados en medio de cultivo sin carbón activado.

Asimismo se pudo observar que los bulbillos obtenidos in vitro surgen de brotes, vistos a manera de pequeñas protuberancias (figura 8), que se forman en la mayoría de los casos entre los dos catáfilos del explante. Estos brotes se observan mejor a la segunda semana de cultivo. Si los brotes son formados en la oscuridad mantendrán el color blanco (figura 8) al igual que el explante, si por el contrario los explantes son expuestos a luz, los brotes que se forman son de color verde al igual que el explante que les da origen (figura 9).

Posteriormente conforme pasan las semanas estos brotes van alcanzando mayor tamaño definiendo su forma, los cuales pueden alcanzar el peso de 0.5 gramos entre la quinta y la séptima semana (figura10).

4.3. Efecto de la luz y de los tratamientos hormonales sobre la regeneración de bulbillos (formación de bulbillos sobre los explantes)

4.3.1. Primer Experimento

La introducción a condiciones in vitro fue en Marzo, antes del periodo de crecimiento de *I. amancaes* en las lomas, por la cual los bulbos utilizados carecían de hojas y flores.

Después de una semana de su introducción se observó un alto porcentaje de contaminación (73.5%) por microorganismos. Para este experimento el material biológico fue desinfectado con 2,6% de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) por 15 minutos (cuadro 5). La inducción fue solamente del 8,4% del total de las unidades experimentales (320) colocados tanto en luz como en oscuridad.

Este alto índice de contaminación impidió que se realizara el análisis estadístico correspondiente debido a los insuficientes datos de respuesta. Sólo pudo ser analizado los resultados del segundo y tercer experimento.

4.3.2. Segundo Experimento

El segundo experimento se realizó en Abril. Los bulbos utilizados carecían también tanto de hojas y flores por que se encontraban antes del período de crecimiento de *I. amancaes* en las lomas.

Se observó aproximadamente un 22.5% de contaminación. Esto se logró aumentando el tiempo de exposición del material biológico en NaOCl (30

minutos), ver cuadro 5.

Los tratamientos hormonales influyeron en el número de explantes regenerantes. Es así como los tratamientos colocados en el ambiente con luz (un fotoperiodo de 16 horas) se obtuvieron un mayor número de explantes inducidos, particularmente en los tratamientos 15 BAP/0.0 ANA, 5.0 BAP/0.5 ANA y 0.0 BAP/0.5 ANA, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (figura 11).

En los tratamientos hormonales colocados en el ambiente con oscuridad continua se obtuvo mayor número de explantes inducidos particularmente en los tratamientos 0.0 BAP/0.5 ANA, y 15 BAP/0.0 ANA. Aunque las diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas (figura 12).

Al comparar la regeneración obtenida tanto en el ambiente con un fotoperiodo de 16 horas diarias y en oscuridad continua, se observó una regeneración superior en el ambiente con luz (24% en luz en comparación con 19.5% en oscuridad), sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (cuadros 6, 7, y 8).

Al analizar independientemente el efecto de la concentración de las hormonas ANA y BAP, no se encontró diferencias significativas, sin embargo se obtuvo una tendencia en ANA. Donde la hormona ANA a la concentración de 0.5 mg/L, indujo un mayor número de explantes regenerantes (cuadro 9).

4.3.3 Tercer Experimento

El tercer experimento se realizó en Setiembre, Los bulbos empleados en este experimento presentaba hojas en senescencia ya que fueron introducidos posterior a la época de crecimiento en lomas.

Para la desinfección de los bulbos se aumentó de la concentración de NaOCl a un 4% (30 minutos), obteniéndose sólo un 6.6 % de contaminación (cuadro 5).

En cuanto a los tratamientos hormonales se observó que estos influyeron en la inducción de los bulbillos. Es así como los tratamientos colocados en un ambiente con fotoperiodo de 16 horas diarias indujeron una mayor regeneración de explantes particularmente los tratamientos 5.0 BAP/0.0 ANA y 10 BAP/1.5 ANA (figura 13). Aunque no se encontró diferencias significativas.

Con respecto a los tratamientos colocados en el ambiente con oscuridad continua, las combinaciones hormonales de 0.0 BAP/1.5 ANA y 15 BAP/0.0 ANA dieron el mayor número de explantes inducidos (figura 14). Tampoco se encontró diferencias significativas.

Al comparar la regeneración de bulbillos en los tratamientos colocados en los ambientes con luz y oscuridad continua se observó una regeneración superior en luz (fotoperiodo de 16 horas diarias), sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (cuadro 6, 10 y 11).

V. DISCUSIÓN

5.1 Desinfección

Anteriormente no se han reportado trabajos en cultivo de tejidos con *Ismene amancaes* y menos se tienen programas de mejoramiento. Mientras que en especies bulbosas del género *Crinum*, *Hyacinthus*, *Narcissus*, etc., los cuales se han domesticado varias décadas atrás, sí los tienen. Esto motivó que se diseñara un protocolo para *I. amancaes* tomándolos como modelos, aunque no necesariamente pueden funcionar igual. Por ejemplo en *Amaryllis belladonna* cuyo método de desinfección aplicado tuvo que ser mejorado para reducir los altos índices de contaminación. Así mismo ocurrió con *I. amancaes*, donde además no se utilizó material biológico de invernadero, laboratorio o de cuartos de crecimiento como se recomienda (George, 1996), sino que se utilizó material silvestre.

En el primer experimento sólo se logró un 26.5% de desinfección. Este resultado se explica por el uso de bulbos en estado silvestre que portan un alto grado de contaminantes (bacterias y hongos) por ello fue necesario desarrollar un método de desinfección, como lo recomienda Barlass & Hutchinson (1996). El bulbo, órgano de reserva y permanente que se mantiene enterrado, se encuentra en contacto directo con el suelo por lo que mantiene una alta carga de microorganismos a diferencia de otros órganos de la planta como son las hojas, flores o tallos florales los cuales se encuentran suspendidas sobre la superficie del suelo y son temporales.

En el segundo experimento, con el aumento del tiempo de la exposición del material biológico al desinfectante se aumentó el porcentaje de éxito de la desinfección, teniendo un 80% aproximadamente; semejante al porcentaje que mencionan Pierik & Post (1975), para la desinfección de *Hyacinthus orientalis* L.

Buscando reducir más el porcentaje de contaminación y aumentar los explantes regenerantes de brotes, para el tercer experimento se aumentó la concentración de lejía (4%), lo cual nos dio como resultado un 93.4% de desinfección. El método desarrollado es óptimo aunque podría ser mejorado.

Ensayos realizados en bulbos silvestres a diferentes porcentajes y tiempos de exposición al desinfectante, nos mostró una relación estrecha inversamente proporcional con respecto al grado de contaminación. Corroborando que la contaminación es un factor intrínseco del material biológico silvestre y no a un factor humano.

5.2 Formación de bulbillos

El principal método de propagación en las monocotiledóneas bulbosas desde hace más de dos décadas atrás ha sido la inducción de brotes adventicios. Las bases de, las escamas simples o las de doble escamado pueden formar un brote o brotes sobre medios libre de hormonas: Sin embargo la adición de hormonas como la auxina y citocininas aumenta su producción (Hussey, 1982). Para el caso de los brotes adventicios inducidos sobre el doble escamado, los estudios histológicos han mostrado en *Allium*, *Narcissus* y *Nerine* (Hussey et al., 1980; Fujieda et al., 1979; Hussey, 1982; Grootaarts, 1981.) que aparecen

por divisiones en la epidermis y en una capa interna de células en la superficie abaxial cerca de la unión con la placa basal. Hussey (1982) sugiere que este modo de formación de meristemas basales sería aplicable a todas las bulbosas. Nosotros confirmamos lo mencionado por Hussey (1982) para la propagación in vitro de *Ismene amancaes*.

La producción in vitro de bulbillos a partir de escamas de bulbos dependen de 2 procesos: la regeneración y el crecimiento. Las observaciones realizadas en la regeneración y crecimiento de los bulbillos de amancay sobre los explantes de escamado doble son semejantes a las respuestas obtenidas por otras especies bulbosas como por ejemplo, *Lilium longiflorum* Thumb. Luego de 9 a 10 días de cultivado los explantes de escamas individuales, aparece unos brotes sobre la superficie abaxial de la escama a manera de pequeñas protuberancias blancas, los cuales fueron los primeros signos de desarrollo y que a los 20 días de cultivo fueron ya claramente visibles (Leshem et al., 1982). Hosoki & Asahira (1980) indican además que el desarrollo de un bulbo en cultivo después de la formación de un brote, mejora la supervivencia en la transferencia hacia el suelo.

5.3 Efecto de la luz y de los tratamientos hormonales sobre la regeneración de bulbillos

Factor luz

Uno de los factores externos considerado por varios autores en la regeneración de bulbillos es la luz. Así, en trabajos realizados con *Lilium longiflorum*, Stimart & Ascher (1978), mencionan que la luz inhibe la formación de bulbillos, siendo

más favorable la oscuridad (Niimi & Onozawa, 1979). En *Narcissus tazetta*, se encontró que la luz tiene un efecto represivo sobre la regeneración y crecimiento de bulbillos (Steinitz & Yahel, 1982). En los tres experimentos realizados con *el amancay* no se encontró diferencias significativas de los niveles de luz aplicados (oscuridad total y 16 horas de luz) en los explantes regenerantes. Sin embargo los tratamientos hormonales que nos dieron un número mayor de explantes regenerantes son los que estuvieron con luz que los tratamientos que fueron colocados en oscuridad (Cuadro 6).

Tratamientos hormonales

Las diferentes combinaciones hormonales tuvieron una influencia en la regeneración de bulbillos, aunque no hubo diferencias significativas entre ellos. Así mismo se observó una variación en la respuesta de los explantes colocados en las mismas combinaciones hormonales según la fecha de instalación del experimento (abril y setiembre). En el experimento instalado en setiembre se obtuvo menos explantes regenerantes a pesar que se aumentó el número de explantes libre de contaminación.

Esta variación en la respuesta en los experimentos puede ser debido a que la planta presentaba en cada fecha una tasa metabólica diferente asociada a su estado fisiológico. En un trabajo realizado para observar el desarrollo reproductivo de *Ismene amancaes* (observación personal, 2004), se observó que la formación de yemas florales en el interior del bulbo se da desde enero hasta mayo, aumentando su tasa metabólica y que después de emerger la hojas y flores, mas o menos en setiembre, su actividad metabólica va

disminuyendo al no desarrollarse cambios en el interior del bulbo. Esto mismo se da en otros cultivos como por ejemplo en *Amarillis belladonna* L., el cual aumenta su tasa metabólica al comienzo del crecimiento de la planta (otoño) y disminuye al término de su ciclo biológico (primavera), disminuyendo la formación de bulbillos (De Bruyn et al., 1992). Esto muestra que es muy necesario tener cuenta el ciclo biológico de *Ismene amancaes* para determinar la época adecuada de colecta de los bulbos al menos si se va a proceder a su propagación inmediata.

VI. CONCLUSIONES

La especie *Ismene amancaes* (R.&P.) Herbert puede ser micropropagado exitosamente por la técnica de escamado doble (twin scales).

En cuatro o cinco semanas se obtienen bulbillos mediante la inducción de brotes adventicios.

Los resultados obtenidos de la micropropagación son mejores a partir de bulbos colectados en periodos previos o en pleno crecimiento de la planta.

No se encontró diferencias significativas en cuanto al factor luz, aunque se obtuvo mayor número de explantes inducidos en los tratamientos colocados en ambiente con fotoperiodo de 16 horas en todos los experimentos.

Los mejores tratamientos obtenidos en el ambiente con fotoperiodo de 16 horas son 15 BAP/0.0 ANA, 5.0 BAP/0.5 ANA y 0.0 BAP/0.5 ANA para el segundo experimento y 5.0 BAP/0.0 ANA y 10 BAP/1.5 ANA para el tercer experimento. Estas respuestas obtenidas en cada experimento se debe al diferente estado fisiológico de la planta.

Para el establecimiento de los bulbillos en el campo no es necesario que estos tengan raíces, ya que los producirán al instalarlos en el invernadero.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda tener el cuidado adecuado para eliminar microorganismos contaminantes sin dañar el tejido que se quiere propagar.

Evaluar el uso de explantes alternativos al doble escamado que sean menos destructivos.

Se recomienda usar bulbos grandes para la propagación.

Se sugiere evaluar dentro de los rangos recomendados para obtener la combinación hormonal óptima.

Es necesario en el país crear un programa de mejoramiento en esta especie que se encuentra en una situación de vulnerabilidad (Decreto Supremo N° 043-2006-AG).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÜERO, S. 2002. Efecto de la humedad edáfica en el desarrollo y propagación de *Ismene amancaes* R.& P. "amancaes" (AMARYLLIDACEAE) en condiciones "in situ" y "ex situ". Tesis de Biólogo. UNMSM. 104 p.

AGÜERO, S. & M. SUNI. 1999. Influencia del evento "El Niño 1997-1998" en el desarrollo de *Ismene amancaes* (AMARILLIDACEAE, LILIOPSIDAE). Revista Peruana de Biología. El Niño 1997-98 y su impacto sobre los ecosistemas marino y terrestre. Vol. Extraordinario. 125-132 p.

BARLASS, M. & J. HUTCHINSON. 1996. Commercial micropropagation of Australian native plants. Taji, A.M. and Williams, R.R. (Eds). In: Tissue Culture of Australian Plants: past, present and future. Chapter 6..University of New England Press, Armidale. 180-203 p

BRACK, A. & C. MENDIOLA, 2000. Ecología del Perú. Ed. Bruño. PNUD.

BRAKO & ZARUCCHI. 1993. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Perú. Missouri Botanical Garden. 45: 1286 p.

CANO, A.; M. LA TORRE, J. ROQUE, & A. RAMÍREZ. 2002. Flora vascular de las lomas de Amancaes, Lima. IX Congreso Nacional de Botánica. Iquitos-Perú. 217 p.

CHANG, CH.; CH. CHEN., Y. TSAI. & W. CHANG. 2002. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thumb. Var. *gloriosoides* Baker. Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 139-142.

CUYA, O. & S. SÁNCHEZ. 1991. Flor de amancaes, lomas que deben conservarse. Boletín de Lima. 76: 59-64 p.

DE BRUYN, M. H.; D. I. FERREIRA, M. M. SLABBERT. & J. PRETORIUS. 1992 In vitro propagation of *Amaryllis belladonna*. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 31: 179-184.

EL PERUANO. (2006). Normas Legales: Decreto Supremo N° 043-2006-AG: Categorización de especies amenazadas de flora silvestre. Jueves 13 de julio del 2006. Poder Ejecutivo.

FUJIEDA, K.; N. MATSUOKA., & Y. FUJITA. 1979. An in vitro method for the conservation and storage of garlic (*Allium sativum*) germplasm. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 48:186-194.

GEORGE, E.F. (Ed). 1996. Plant Propagation by Tissue Culture, Parts 1 & 2. Exegetics Ltd, Edington, Wilts.

GROOTAARTS, H.; SCHEL, J. & PIERIK, R. 1981. The origin of bulblets formed on excised twin scales of *Nerine bowdenii* W. Watts. Plant, cell and

organ culture. 1:39 - 46.

GUEVARA, M.; O. BRACAMONTE, A. LÓPEZ, J. TELLO, E. PASCUAL & D. SHOWING. 2003. Estudio preliminar de la citogenética de *Ismene amancaes* "amancaes". XII Reunión Científica ICBAR- 2003. 66 p.

HARTMANN, H. & D. KESTER. 1995. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Editorial Continental. Cuarta reimpresión. México. 519 p

HERRERA, F. 1940. La flor limeña, el amancay. Boletín del Museo de Historia Natural "Javier Prado". Lima. N° 4, pp. 202-204.

HOSOKI, T. & T. ASAHIRA. 1980. In vitro propagation of *Narcissus*. HortScience. 15: 602-603.

HUGUES, K. 1981. Ornamental species. Conger, B. V. (ed.). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos.

HUSSEY, G. 1980. Propagation of some members of Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae by tissue culture. Petaloid Monocotyledons. (Brikell, C; Cutler, D. A nd Gregory, M., (editors) Academic Press 33-42. p.

HUSSEY, G. 1982a. In vitro Propagation of *Narcissus*. *Annals of Botany*. 49:707-719.

HUSSEY, G. 1982b. In vitro propagation of monocotyledonous bulbs and corms. *Proc. 5 th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell culture*. 677-680.

KIM, Y. J.; P. HASEGAWA & R. BRESSAN. 1981. In vitro propagation of *Hyacinth*. *HortScience* 16(5): 645-647.

LESHEM, B.; H. LILIEN-KIPNIS & B. STEINITZ. 1982. The effect of light and of explant orientation on the regeneration and subsequent growth of bulblets on *Lilium longiflorum* Thumb. bulb scale sections cultured in vitro. *Scientia horticultrae*, 17: 129-136.

LE NARD, M. & A. DE HERTOIGH. 2002. Research needs for flower bulbs (Geophytes). *Acta Hort. (ISHS)* 570:121-127

http://www.actahort.org/books/570/570_12.htm

MILLER, C.; F. SKOOG, M. VON SALTA. & M. STRONG. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77:1392

MURASHIGUE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-497.

MURASHIGUE, T. 1978. The impact of plant tissue culture of agriculture. Thorpe, T. (ed.). Frontier of plant tissue culture. University of Calgary, Calgary, Canadá. 15-26 p.

NIIMI, Y. & T. ONOZAWA. 1979. In vitro bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. Scientia Hort., 11: 379 – 389.

NOBENCOURT, P. 1939. Sur les radicelles naissant des cultures de tissus vegetaux. C. R. S. Soc. Biol. 130:1271

PIERIK, R. AND A. POST. 1975. Rapid vegetative propagation of *Hyacinthus orientalis* L. in vitro. Sci. Hort. 3:293-297.

REYES, M. 2000. Una historia que no se marchita. Crónica. Pétalos Limeños. En "El Comercio" sección A., Lima 21 de Noviembre. 16 p.

ROCA, W. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia.

SKOOG, F. 1944. Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. Amer. J. Bot. 31: 19-24

SKOOG, F. & C. MILLER. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-130.

SOUKUP, J. 1993. Vocabularios de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogos de los géneros. Editorial Salesiana. 2 da Edición. Lima 437 p.

STEINITZ, B. & H. YAHEL. 1982. In vitro propagation of *Narcissus tazetta*. HortScience 17(3):333-334.

STIMART, D. & P. ASCHER. 1978. Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 103:182-184.

STONE, O. & HOLLING, M. 1970. Heat treatment and meristem-tip culture. Ann. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. P. 141-143.

STONE, O. M. 1973. The elimination of viruses from *Narcissus tazetta* cv. Grand Soleil d'Or, and rapid multiplication of virus-free clones. Ann. App. Biol. 73:45-52.

SUNI, M.; V. RIMARACHÍN. Y S. AGÜERO. 2001. Biología de *Ismene amancaes* "amancaes" bajo condiciones de cultivo "ex situ". Reunión Científica del Instituto Ciencias Biológicas Antonio Raimondi (ICBAR). UNMSM, p.50.

THORPE, T. 1983. Biotechnological applications of tissue culture to forest tree improvement. En: Biotechnological Advances. v. 1, 263-278 p.

TRAUB, H.P. 1963. The genera of Amarillidaceae. La Jolla: The American Plant Life Society.

ULRICH, M.; F. DAVIES. Y. CHEONG, S. DURAY. & J. EGUILLA. 1999. Micropropagation of *Crinum* "Ellen Bosanquet" by tri-scales. Sci. Hortic.82. 95-102.

VELARDE, O. 1947. Estudio sobre el amancaes de la región de Paramonga *Paramongaia weberbaueri* Velarde y sus relaciones sistemáticas. Tesis de Biólogo. UNMSM.

WHITE, P. 1939. Controlled differentiation in a plant tissue culture. Bull. Torrey Bot. Club 66:507-513.

ZAIDI, N.; N. HABIB KHAN & S. IQBAL ZAFAR. 2000. Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants in vitro. Quarterly Science Vision. 6 (1): 58 – 73.

IX. ANEXOS

Cuadro 1.- Tratamiento aplicados en la inducción de bulbillos de *Ismene amancaes*.

Factor luz	Numero de tratamientos hormonales	Niveles de Hormona	
		NAA (mg/L)	BAP (mg/L)
16 HORAS LUZ	1	0	0
	2	0	5
	3	0	10
	4	0	15
	5	0.5	0
	6	0.5	5
	7	0.5	10
	8	0.5	15
	9	1	0
	10	1	5
	11	1	10
	12	1	15
	13	1.5	0
	14	1.5	5
	15	1.5	10
	16	1.5	15
OSCURIDAD	1	0	0
	2	0	5
	3	0	10
	4	0	15
	5	0.5	0
	6	0.5	5
	7	0.5	10
	8	0.5	15
	9	1	0
	10	1	5
	11	1	10
	12	1	15
	13	1.5	0
	14	1.5	5
	15	1.5	10
	16	1.5	15

Cuadro 2.- Estructura del análisis estadístico

Fuentes de variación	Grados de libertad
Factor iluminación	1
Hormona ANA	3
Hormona BAP	3
Hormona ANA *	
Hormona BAP	9
Total	15

Cuadro 3. Características del material biológico, fechas de colecta de los bulbos y de instalación de los experimentos

Experimentos establecidos	Fecha de colecta (mes y año)	Fecha de Instalación (día y mes)	Peso promedio de bulbos (g)	Ø promedio de bulbos (cm)
Primero	enero-2004	19 de Marzo - 2004	75,28 +/- 10,47	5,02 +/- 0,32
Segundo	marzo-2004	12 de Abril - 2004	39,68 +/- 5,94	3,56 +/- 0,22
Tercero	julio-2004	2 de Septiembre - 2004	51,75 +/- 5,91	—————

Ø = diámetro

Cuadro 4. Ensayo de desinfección obtenido luego de aplicar hipoclorito de sodio en la concentración y tiempo indicados, evaluación a lo 3, 7 y 14 días. Obsérvese los datos expresados en porcentaje de contaminación

Periodo de cultivo (días)	Tratamiento de desinfección con NaOCl			
	concentración (%)			
	tiempo en minutos (')			
	2,60%		4%	
	15'	30'	15'	30'
3	81,25	12,5	0	0
7	100	25	12,5	6,25
14	100	31,25	31,25	6,25

Cuadro 5. Características de la desinfección del material biológico en los experimentos desarrollados.

Experimentos planteados	Desinfección con NaOCl conc(%) tiempo(')	Porcentaje de contaminación de los explantes
Primero	2.6% 15'	(73.5%) 235
Segundo	2.6% 30'	(22.5%) 72
Tercero	4% 30'	(6.6%) 21

Cuadro 6. Efecto del factor luz en la inducción de bulbillos en los experimentos realizados en *Ismene amancaes*.

	Porcentaje de inducción de bulbillos (%)	
	Luz (16h)	Oscuridad
Primer experimento	34.9	23.8
Segundo experimento	24	19.5
Tercer experimento	18.7	13.3

Cuadro 7.- Análisis de varianza del segundo experimento. Respuesta: raíz cuadrada

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr(>F)
Factor luz	1	0,29946	0,29946	2,1803	0,16047
Horm ANA	3	1,13564	0,37855	2,7562	0,07885
Horm BAP	3	0,10036	0,03345	0,2436	0,86458
Horm ANA* Horm BAP	9	2,63562	0,29285	2,1322	0,09368
Residuals	15	2,06015	0,13534		
CV.		25,85052			

Cuadro 8.- Efecto del factor luz sobre la inducción de bulbillos en el segundo experimento, análisis de varianza (ANOVA). Obsérvese el mayor valor obtenido por el factor luz.

Factor luz	Nº de explantes regenerados
Luz	2,0
Oscuridad	1,5
ANOVA	ns

Cuadro 9.- Efecto de la hormona ANA en la formación de bulbillos en el segundo experimento. Obsérvese la tendencia del incremento en relación a la concentración de ANA.

ANA (mg/L)	Número de bulbillos inducidos por explante
1	1
1,5	1,5
0	2,13
0,5	2,38
ANOVA	0,138

Cuadro 10.- Análisis de varianza del tercer experimento. Respuesta: raíz cuadrada

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr(>F)
Factor luz	1	0,45172	0,45172	2,7961	0,1152
Horm ANA	3	0,33657	0,11219	0,6945	0,5696
Horm BAP	3	0,06513	0,02171	0,1344	0,9380
Horm ANA* Horm BAP	9	1,26037	0,14004	0,8668	0,5725
Residuals	15	2,42329	0,16155		

cv. 29,73661

Cuadro 11.- Efecto del factor luz sobre la inducción de bulbillos en el tercer experimento, análisis de varianza (ANOVA)

Factor luz	Nº de explantes regenerados
Luz	1.8
Oscuridad	1.2
ANOVA	ns

Figura 1.- Ubicación del “Santuario de Amancay”. Obtenido del tríptico del Santuario de Amancay (PRODNA AREQUIPA).



Figura 2.- Zona de colecta de los bulbos en las lomas del Santuario de Amancay



Figura 3.- Bulbo colectado en las lomas del distrito de Pachacamac. Observe las características del bulbo del Amancay.



Figura 4.- Bulbos de amancay en la cual se retiró parte de la túnica (escamas secas de color marrón) y las raíces. Obsérvese las escamas frescas que son de color blanco.



Figura 5.- Bulbo en la cual se ha descartado los dos tercios superior del bulbo. Obsérvese el tercio inferior del bulbo el cual presenta la placa basal (**pb**) del cual salen las escamas concéntricas (**es**) que van a servir como explantes.

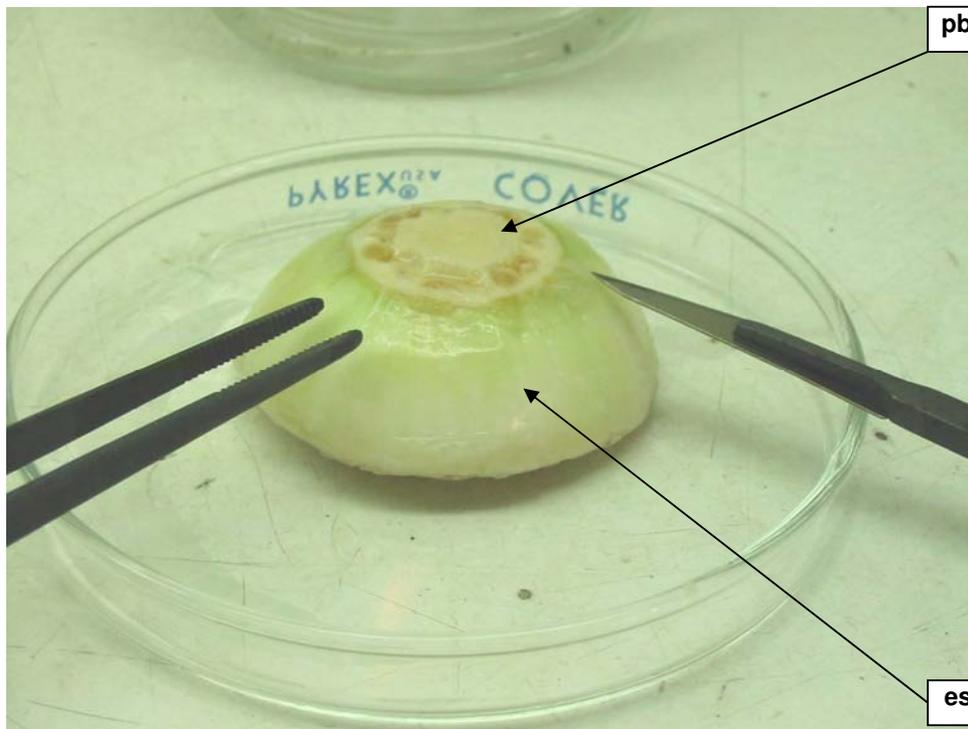


Figura 6.- Obtención de los explantes. Los explantes consisten en dos porciones de escamas unidas por un segmento de la placa basal.



Figura 7.- Explantes colocados en los tubos con medios de cultivos.

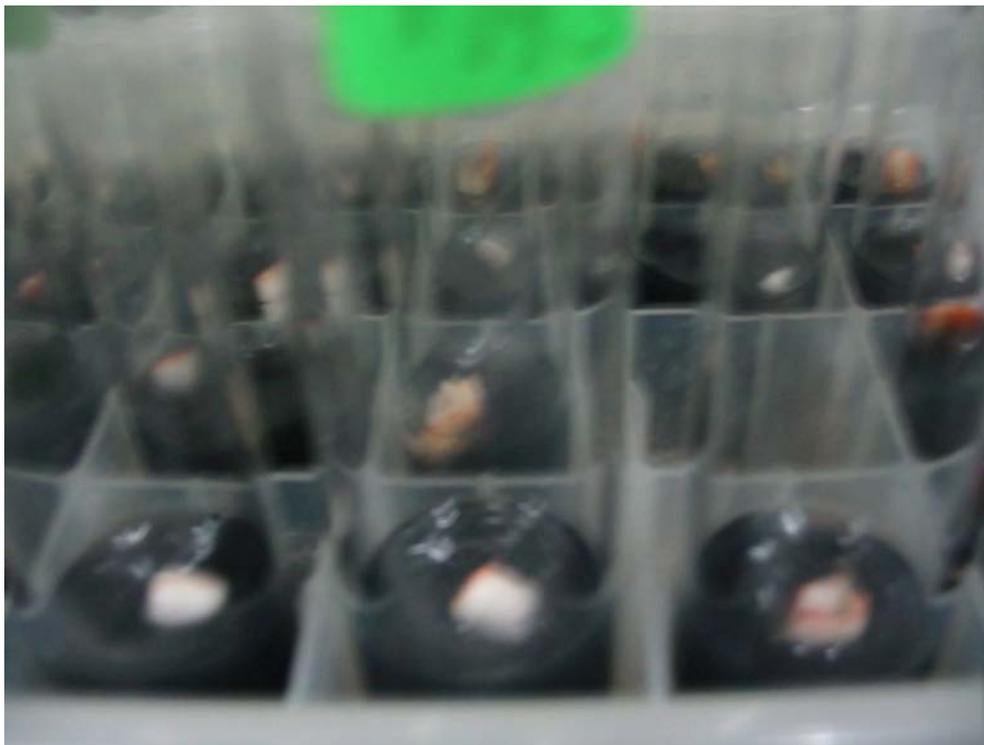


Figura 8.- Formación de brotes adventicios del tratamiento en oscuridad el explante de *Ismene amancaes* a la segunda semana. Obsérvese la formación de brotes (br) de color blanquecino debido a la falta de luz entre las dos escamas (es) blanquecinas también.

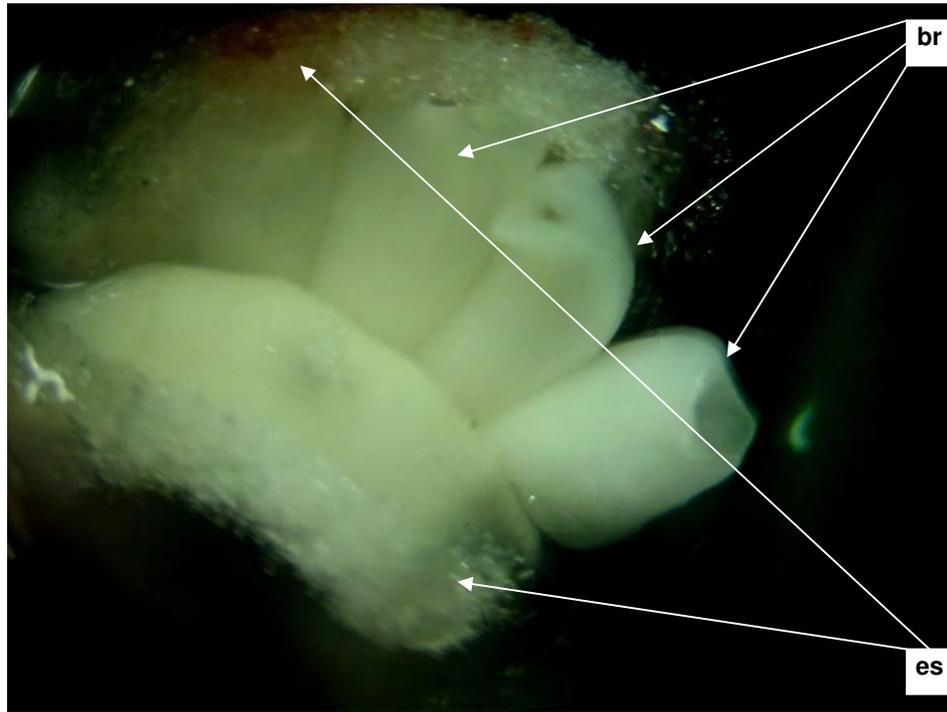


Figura 9.- Formación de brotes adventicios del tratamiento en luz con fotoperiodo de 16 horas luz de *Ismene amancaes* a la segunda semana. Obsérvese que los dos brotes (br) formados entre las dos escamas (es).

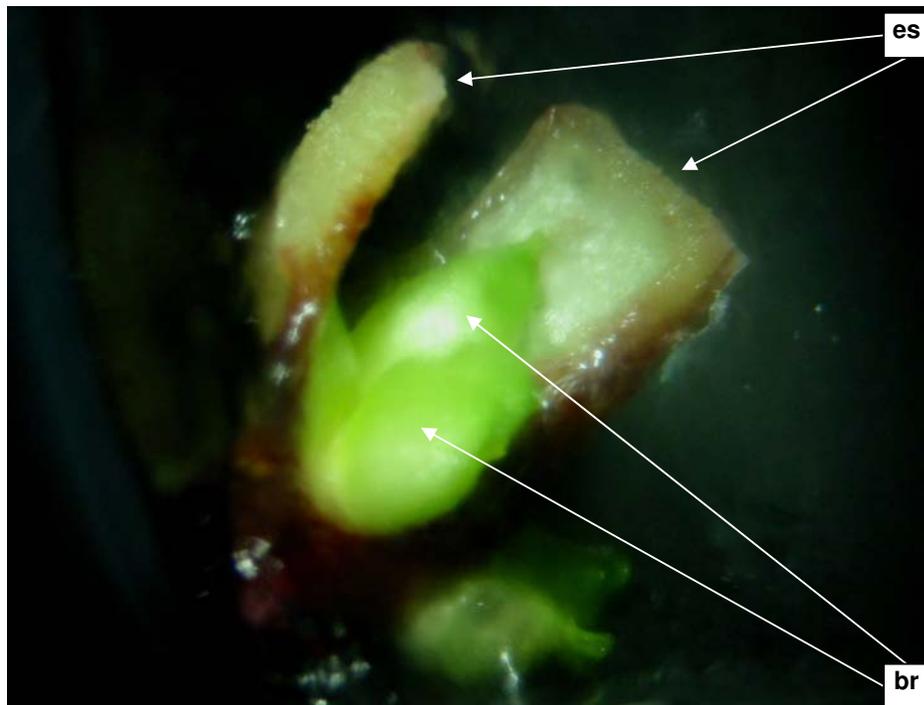


Figura 10.- Bulbillos desarrollados (flechas) a la quinta semana de cultivo. Nótese las características de los bulbillos.



Figura 11.- Número de explantes regenerantes por tratamiento hormonal bajo condiciones de luz (fotoperiodo de 16 horas diarias) para el segundo experimento. Se utilizaron 10 repeticiones por cada tratamiento. Obsérvese los tratamientos con mayor número de explantes inducidos (flechas).

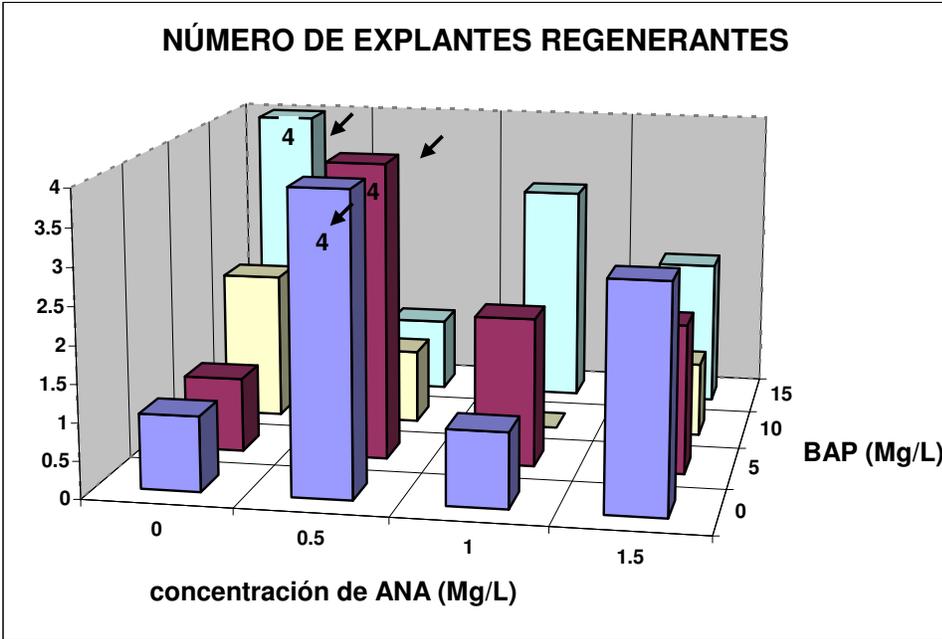


Figura 12.- Número de explantes regenerantes por tratamiento hormonal en oscuridad continúa para el segundo experimento. Se utilizaron 10 repeticiones por cada tratamiento. Obsérvese los tratamientos con mayor número de explantes inducidos (flechas).

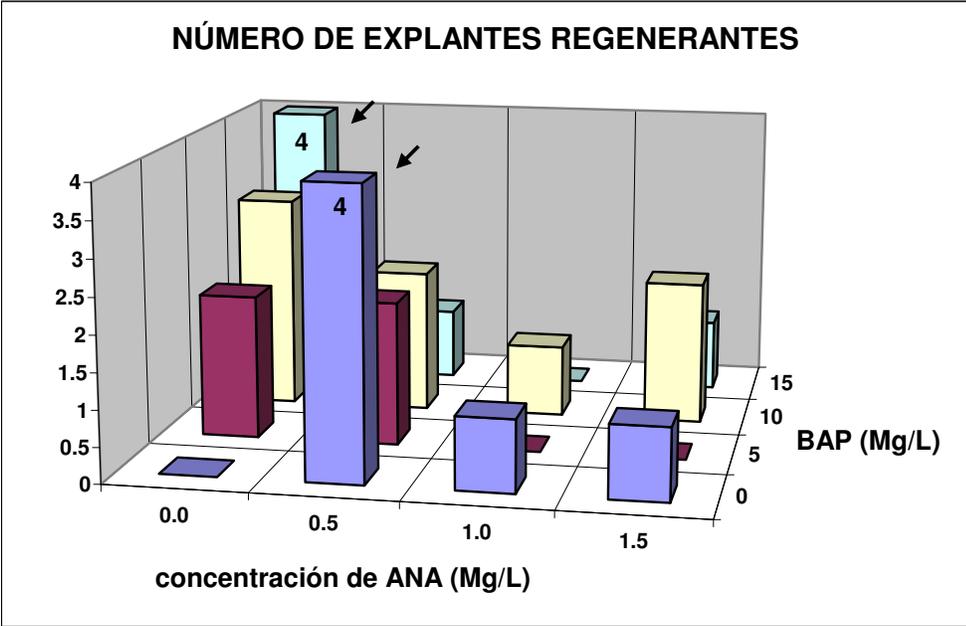


Figura 13.- Número de explantes regenerantes por tratamiento hormonal bajo condiciones de luz (fotoperiodo de 16 horas) para el tercer experimento. Se utilizaron 10 repeticiones por cada tratamiento. Obsérvese los tratamientos con mayor número de explantes inducidos (flechas).

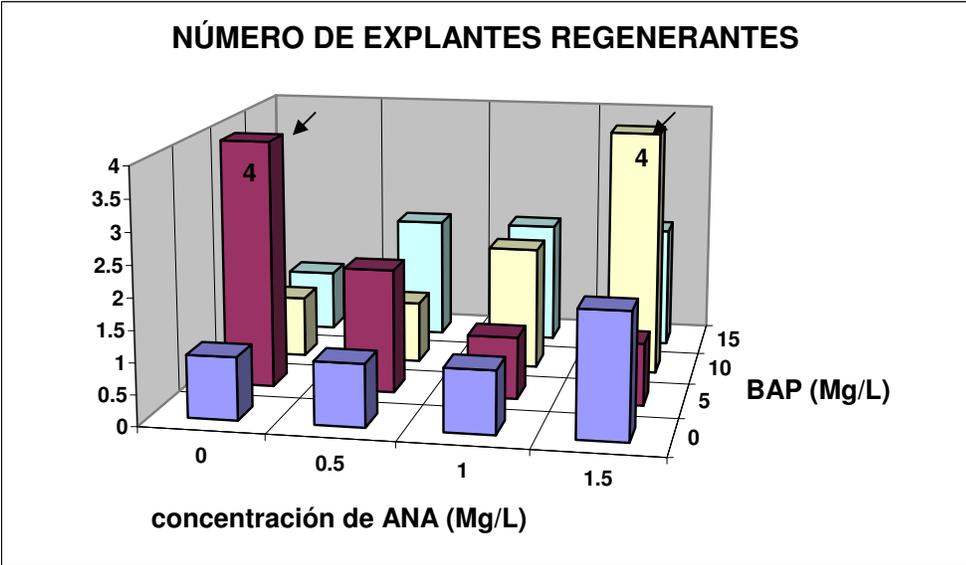


Figura 14.- Número de explantes regenerantes por tratamiento hormonal en oscuridad continúa para el tercer experimento. Se utilizaron 10 repeticiones por cada tratamiento. Obsérvese los tratamientos con mayor número de explantes inducidos (flechas).

